

OPTIMASI TRANSFORMASI GENETIKA MELALUI AGROBACTERIUM PADA TANAMAN PADI

[OPTIMIZATION OF AGROBACTERIUM-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION IN RICE]

Oleh

Muhammad Hazmi¹⁾, Netty Ermawati²⁾, dan Bambang Sugiharto³⁾

¹⁾ Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian UM Jember

²⁾ Laboratorium Biosain, Politeknik Jember

³⁾ Laboratorium Biologi Molekul, Laboratorium Biologi Dasar, FMIPA Universitas Jember

Penulis korespondensi. Email : mhazmi.hazmi@gmail.com

ABSTRAK

Keberhasilan transformasi genetik pada tanaman padi sangat dipengaruhi oleh karakternya yang bersifat recalcitrant, terutama padi jenis indica yang banyak ditanam oleh petani di Indonesia. Oleh karena itu, optimasi metode selalu diperlukan sebelum melakukan transformasi genetik pada tanaman padi. Transformasi gen GUS sering digunakan sebagai sarana optimasi metode transformasi sebelum melakukan overekspresi gen yang sesungguhnya. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa komponen transformasi gen melalui *Agrobacterium tumefaciens* dapat bekerja secara efektif pada tanaman padi. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biosain Politeknik Jember dari bulan Maret sampai dengan Desember 2013. Konstruksi gen GUS diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember. Padi yang digunakan adalah varietas Inpari 20 dari BPTP Malang dan CV Dongjin dari Korea Selatan sebanyak 20 biji dari setiap varietas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi gen GUS melalui *Agrobacterium tumefaciens* berhasil menginfeksi eksplan. Eksplan yang diinfeksi tumbuh pada media seleksi antibiotik higromisin sampai umur 65 hari setelah infeksi. Hasil uji GUS menunjukkan bahwa gen GUS tidak terekspresi pada tanaman Padi. Hal ini menunjukkan bahwa ada kemungkinan DNA promoter dan plasmid pCAMBIA tidak kompatibel pada tanaman padi. *Agrobacterium tumefaciens* dapat digunakan untuk transformasi genetik pada tanaman padi, tetapi perlu DNA promoter dan plasmid yang kompatibel.

Kata kunci: Optimasi, transformasi, gen GUS, *Agrobacterium tumefaciens*, dan padi.

ABSTRACT

Genetic transformation in rice is strongly influenced by recalcitrant character, especially indica rice is widely planted by Indonesian farmers. Therefore, the optimization of genetic transformation always required before transforming gene in rice. GUS gene transformation is often used as a optimization of transformation before performing actual gene. This study aims to ensure that the components of *Agrobacterium*-mediated transformation can work effectively in rice. The experiment was conducted at the Biosain Laboratory of the Jember Polytechnic from March to December 2013. GUS gene construct was obtained from the Molecular Biology Laboratory of Jember University. Rice varieties used are Inpari 20 of BPTP Malang and CV Dongjin of South Korea as much as 20 seeds from each. The results showed that the GUS gene transformation is implemented successfully infect explants. Infected explants can grow on the antibiotic hygromycin selection media until 65 days after infection. The GUS assay showed that GUS gene is not expressed in rice. This suggests that there is a possibility of promoter DNA and plasmid pCAMBIA not compatible on rice. *Agrobacterium tumefaciens* can be used for genetic transformation in rice, but need the compatibility of DNA promoter and plasmid.

Keywords : Optimization , transformation , GUS gene , *Agrobacterium tumefaciens*, and rice .

PENDAHULUAN

Peningkatan produksi padi dapat dilakukan dengan memperluas area tanam dan meningkatkan produktivitasnya. Upaya peningkatan produktivitas padi sudah banyak dilakukan melalui pemuliaan tanaman dengan persilangan. Transformasi genetik dengan menyisipkan gen yang berhubungan dengan peningkatan kinerja biosintesis pati (starch) dan atau

sukrosa merupakan alternatif cara meningkatkan produktivitas padi yang perlu dipelajari secara intensif.

Kinerja jaringan fotosintetik tanaman Padi dalam biosintesis pati sangat mungkin dapat ditingkatkan dengan menyisipkan gen tertentu, seperti gen sucrose-phosphate synthase (SPS). Sucrose-phosphate synthase adalah enzim yang menjadi katalisator pembentukan sukrosa pada tanaman. Sugiharto dkk. (1997) berhasil mengisolasi gen (cDNA) sucrose-phosphate synthase (SPS) dari

jaringan fotosintetik tanaman tebu (*SoSPS1*). Penyisipan gen *SoSPS1* dapat meningkatkan sistesis sukrosa pada tanam tebu, tomat, dan tembakau.

Keberhasilan penyisipan gen *SoSPS1* pada tanaman Padi sangat dipengaruhi oleh karakternya yang bersifat recalcitrant, terutama padi jenis indica yang banyak ditanam oleh petani di Indonesia. Padi jenis indica sulit diregenerasikan secara kultur jaringan, sehingga tingkat efisiensi transformasi genetiknya selalu lebih rendah dibandingkan dengan padi jenis javanica atau japonica (Sahoo dkk., 2011). Efisiensi transformasi Padi IRAT 112 (indica) lebih rendah dibandingkan Rojolele (javanica) (Mulyaningih dkk., 2009). Oleh karena itu, optimasi metode transformasi selalu diperlukan sebelum melakukan transformasi genetika pada tanaman Padi (Hazmi dkk., 2011). Transformasi gen *GUS* sering digunakan sebagai sarana optimasi metode transformasi sebelum melakukan overekspresi gen yang sesungguhnya.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Transformasi gen *GUS* dan analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Biosain Politeknik Negeri Jember. Konstruksi plasmid dan kalibrasinya dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Laboratorium Biologi Dasar Fakultas Matematika Ilmu Pasti Alam Universitas Jember. Penelitian kalibrasi metode transformasi genetika melalui *Agrobacterium tumefaciens* dan analisisnya ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai dengan Desember 2013.

Alat dan Bahan yang Digunakan

Peralatan yang digunakan adalah alat-alat standar untuk Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman dan Biologi Molekuler. Bahan yang digunakan adalah bahan standar untuk kultur jaringan tanaman dan transformasi genetika. Benih padi yang digunakan adalah varietas INPARI 20 dari BPTP Malang dan CV Dongjin dari Korea Selatan.

Pelaksanaan Penelitian

Persiapan eksplan

Persiapan dimulai dari pengadaan benih padi dan pembuatan medium kultur untuk transformasi gen *GUS*. Eksplan yang digunakan adalah biji padi yang dikecambahkan. Pengecambahan dilakukan dengan menginkubasi biji padi steril pada medium kultur in vitro. Benih yang berkecambah saja (kelihatan radikulanya) yang digunakan sebagai eksplan.

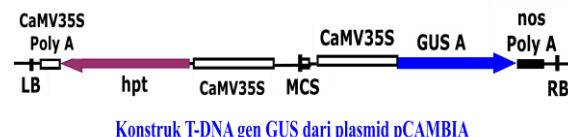
Persiapan *Agrobacterium tumefaciens*

Satu koloni dari *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA (koleksi Laboratorium Biologi Molekuler Biologi Dasar FMIPA UNEJ) yang mengandung konstruk gen *GUS* ditumbuhkan pada 5 ml media yeast extract dan peptone (YEP) cair (Sambrook dkk., 1989) yang mengandung 50 ppm

kanamisin. Kultur *Agrobacterium tumefaciens* sebagai starter diinkubasi sekitar 12 jam yang diletakkan di dalam shaker inkubator dengan kecepatan putaran 85 rpm pada suhu 28°C. Kultur starter *Agrobacterium tumefaciens* sebanyak 1 ml dikultur kembali di dalam media YEP cair 50 ml dan inkubasi di dalam shaker dengan kecepatan putaran 85 rpm pada suhu 28°C sekitar 6 jam. Kultur *Agrobacterium tumefaciens* dipanen, terlebih dahulu diukur kerapatan optik bakterinya dengan alat spektrofotometer, dituang ke dalam tube 50 ml, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Larutan media YEP dibuang dan pelet dilarutkan ke dalam media MS cair ditambah 100 ppm asetosiringon.

Transformasi Gen *GUS* dan *GUS* Assay

Transformasi dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA memuat gen *GUS* yang dikendalikan oleh DNA promoter CaMV35S (Toyobo, Inc.). Konstruksi T-DNA gen *GUS* dari plasmid pCAMBIA disajikan pada Gambar 1. Infeksi dilakukan terhadap 20 eksplan per varietas Padi dan *GUS* assay dilakukan terhadap 2 eksplan yang diinfeksi yang diambil secara acak. Analisis *GUS* mengikuti prosedur histochemical oleh Jefferson dkk. (1987) dengan beberapa perubahan. Sampel dicuci satu kali dengan 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), kemudian diinkubasi dengan buffer yang berisi 2 % methanol, 0.3% Triton X-100, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide dan 0.5 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucoronide pada suhu 37°C satu malam.



Gambar 1. Konstruksi T-DNA gen *GUS* dari plasmid pCAMBIA.

Inokulasi dan kokultivasi

Eksplan diinokulasi dengan perendaman ke dalam media MS cair yang mengandung *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA selama 15 menit sambil digoyang perlahan dengan kerapatan optik bakteri 1 (OD₆₀₀=1). Eksplan yang telah diinfeksi disaring dan dicuci dengan MS cair, lalu dikering anginkan di dalam Laminar Air Flow Cabinet (L AFC), dikultur pada media MS padat dengan 100 ppm asetosiringon dan dikokultivasi di dalam gelap selama 3 sampai dengan 4 hari pada suhu 28°C.

Skrining putatif eksplan transforman

Eksplan hasil kokultivasi dicuci 3 kali dengan media MS cair yang mengandung 500 ppm sefotaksim, dikering anginkan di dalam L AFC. Eksplan dikultur pada media MS padat yang mengandung 500 ppm sefotaksim dalam ruang gelap selama satu minggu

untuk mengeliminasi *Agrobacterium tumefaciens*. Setelah satu minggu dipindah lagi dalam media MS ditambah 100 ppm higromisin, dan 500 ppm sefotaksim untuk seleksi antibiotika, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 21 hari.

Regenerasi eksplan menjadi planlet

Eksplan putatif transforman diregenerasikan pada media MS padat yang mengandung 2 mg/l IAA, antibiotik hgromisin dan sefotaksim dengan konsentrasi yang sama dengan pada media seleksi. Kultur selama 2 sampai 4 minggu dengan penyinaran 24 jam (intensitas 2000 lux). Tunas yang tumbuh diduga transgenik disubkultur lagi sampai terbentuk akar.

Analisis PCR

Analisis PCR dilaksanakan sebanyak 30 siklus, pada 98°C selama 10 detik, 55°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, diikuti dengan 5 menit terakhir untuk extension terakhir pada suhu 72°C. Amplikasi DNA dianalisis dengan menggunakan 1% agarose gel electrophoresis dan photographed. DNA yang teramplifikasi dengan PCR dielektroforesis dalam agarose 1%. Cheking PCR Kit (intron) dilaksanakan dengan formulasi:

- DNA Plasmid (pActin dan pCAMBIA) : 2 µl
- 2 x PCR Reactions : 10 µl
- ddH₂O : 8 µl
- 20 µl
- PCR Program: Intron, Anneling 58°C, 10 mnt.
- Primer utk pActin: (Hpt II), Hygromycin
- Primer untuk pCambia

Apabila terlihat ada band DNA dengan ukuran sesuai dengan primer yang digunakan (Hpt II), maka gen GUS berada di dalam konstruk, sehingga dapat digunakan untuk transformasi.

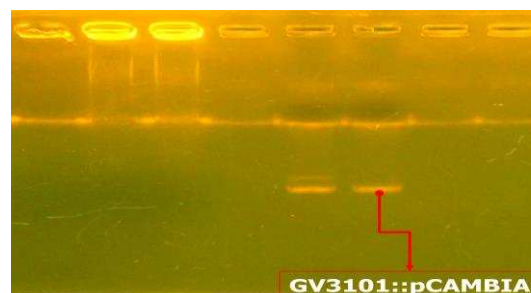
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pCAMBIA

Hasil kultur bakteri menunjukkan bahwa *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA dapat tumbuh dengan baik. Hal ini menunjukkan bahwa *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA dapat melakukan aktivitas biologisnya (Gambar 2). Hasil konfirmasi PCR terhadap keberadaan gen GUS dalam konstruk pCAMBIA menunjukkan bahwa gen GUS masih berada di dalam konstruk (Gambar 3).



Gambar 2. Hasil Kultur *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pCAMBIA .



Gambar 3. Hasil konfirmasi PCR terhadap gen GUS dalam konstruk pCAMBIA.

Eksplan Transformasi Gen GUS

Hasil inkubasi benih Padi varietas Inpari 20 koleksi BPTP Malang dan CV Dongjin menunjukkan bahwa benih padi dari kedua varietas ini dapat berkecambah (Gambar 4). Radikula dari biji padi Inpari 20 terlihat lebih dominan pertumbuhannya. Kalus juga terbentuk pada sebagian besar biji padi. Hal ini menunjukkan bahwa benih padi dari kedua varietas dapat digunakan sebagai eksplan transformasi gen GUS.



Gambar 4. Eksplan transformasi gen GUS.

GUS assay

Hasil Uji GUS terhadap 2 eksplan yang difeksi dari setiap varietas padi yang diambil secara acak, belum menunjukkan adanya spot biru sebagai indikasi bahwa gen GUS terekspresi (Gambar 5). Hal ini kemungkinan terjadi karena kurangnya kompatibilitas plasmid yang digunakan (pCAMBIA) terhadap padi sebagai tanaman monokotil yang bersifat recalcitrant, sehingga ekspresi gen GUS tidak stabil. Kondisi optimum yang dapat menjaga kestabilan ekspresi gen merupakan hal tersulit untuk diperoleh

dalam transformasi genetika melalui *Agrobacterium tumefaciens* (Ombori dkk., 2013). Hal ini terlihat bahwa sisa eksplan yang dikultur pada media MS dapat tumbuh baik bahkan mampu bertahan pada seleksi antibiotik. Transformasi genetika berikutnya perlu memperhatikan penggunaan plasmid lain yang diketahui memiliki kemungkinan kompatibilitasnya terhadap tanaman Padi lebih baik.



Gambar 5. Hasil uji GUS terhadap planlet padi hasil transformasi gen GUS (Tidak terlihat spot biru).

Kultur Planlet Hasil Transformasi Genetika

Hasil kultur *in vitro* menunjukkan bahwa eksplan yang sudah diinfeksi dapat tumbuh pada media seleksi antibiotik higromisin (Gambar 6) meskipun pertumbuhannya tidak secepat tanaman kontrol (Gambar 7). Hal ini menunjukkan bahwa konstruk gen *GUS* kemungkinan besar berhasil ditransformasi oleh T-DNA *Agrobacterium tumefaciens* kedalam sel eksplan, tetapi tidak terekspresi secara sempurna. Hal ini kemungkinan besar menyebabkan hasil uji GUS tidak dapat menunjukkan spot biru. Apabila konstruk gen *GUS* tidak berhasil ditransformasi, maka eksplan yang diinfeksi tidak akan dapat tumbuh pada media yang mengandung antibiotik higromisin sampai berumur 45 hari setelah infeksi (HSI).



Gambar 6. Pertumbuhan planlet pada media seleksi antibiotik pada umur 65 HSI.



Gambar 7. Pertumbuhan padi sebagai tanaman kontrol pada media MS tanpa antibiotik pada umur 65 HSI.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi gen *GUS* melalui *Agrobacterium tumefaciens* yang dilaksanakan berhasil menginfeksi eksplan. Eksplan yang diinfeksi dapat tumbuh pada media seleksi antibiotik higromisin sampai umur 65 hari setelah infeksi. Hasil uji *GUS* menunjukkan bahwa plasmid DNA promoter yang terdapat dalam konstruk plasmid pCAMBIA belum mampu mengekspresikan gen *GUS* secara stabil pada jaringan tanaman padi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh DNA promoter dan plasmid yang digunakan belum kompatibel dengan tanaman padi. Perlu melakukan transformasi gen *GUS* kembali dengan beberapa perbaikan agar penggunaan metode transformasi genetika melalui *Agrobacterium tumefaciens* lebih akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada: Dit Litabmas Dirjen Dikti Depdikbud RI yang telah membiayai penelitian ini, Kopertis Wilayah VII Surabaya, LPPM UM Jember, Lab Biosain Politeknik Jember, Lab Biologi Molekuler Biologi Dasar FMIPA UNEJ, Lab Kultur Jaringan FP UM Jember, Reviewer, peserta seminar hasil penelitian, dan semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Hazmi M., Iskandar, dan B. Sugiharto, 2011. *Transformasi gena sucrose-phosphate synthase tebu melalui Agrobacterium tumefaciens pada tanaman padi (Oryza sativa L.)*. Agritech 13 (1): 15-26.
- Jefferson, R.A. 1987. *Assaying chimeric genes in plants: The gus gene fusion system*. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 287-405.
- Mulyaningsih E.S., R. Hermawan, I. H. Slamet-Loedin. 2009. *Genetic Transformation of Transcription Factor (35S-oshox4) Gene into Rice Genome and Transformant Analysis of hpt Geneby PCR and Hygromycin Resistance Test*. Biodiversitas 10 (2): 63-69.
- Ombori O., J.V.O. Muoma, and J. Machuka. 2013. *Agrobacterium-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (Zea mays L.) lines*. Plant Cell Tiss Organ Cult 113:11–23.
- Sahoo K.K., A.K. Tripathi, A. Pareek, S.K. Sopory, and S.L. Singla-Pareek. 2011. *An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars*. Plant Methods 7:49.
- Sambrook J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis, 1969. *Molecular Cloning a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. America.
- Sugiharto B., Sakakibara H., Sumadi, and Sugiyama T., 1997. *Differential expression of two genes for sucrose phosphate synthase in sugar cane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression*. Plant Cell Physiol. 38:961-965.